

PROCESS FOR PRODUCING SUGAR IN WHICH MOLECULAR WEIGHT IS LOWERED

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

本発明は、低分子化糖の製造方法、及び多糖の低分子化方法に関する。

2. Brief Description of the Background Art

まず、本明細書において用いる単位・略号・用語を説明する。

D a : ダルトン

G y : グレイ

k G y : キログレイ

G A G : グリコサミノグリカン

H A : ヒアルロン酸

C S : コンドロイチン硫酸

C S - A : コンドロイチン硫酸A

C S - C : コンドロイチン硫酸C

C S - D : コンドロイチン硫酸D

C S - E : コンドロイチン硫酸E

D S : デルマタン硫酸 (コンドロイチン硫酸Bともいう)

K S : ケラタン硫酸

H S : ヘパラン硫酸

H e p : ヘパリン

本明細書中の「平均分子量」の語は、重量平均分子量を意味する。

低分子化糖として、種々の薬理活性・生物学的活性を有するものが報告されている。例えばH Aを低分子化した糖については、癌細胞の増殖阻害、熱ショック蛋白質の発現増強、細胞死抑制、細胞障害抑制等の活性が報告されている。またK Sを低分子化した糖については、抗炎症、抗アレルギー、免疫調節等の

活性が報告されている。またHepを低分子化した糖については、成長因子への親和性等の活性が報告されている。

このように、低分子化糖は医薬品や食品等の素材としての可能性を秘めていることから、簡便かつ安価に大量生産できることが望ましい。

低分子化糖の製造方法としては、製造原料となる多糖を溶媒に溶解し、これに酸・アルカリや酵素等を作用させて低分子化させる方法が一般的である。しかし、固体状態の多糖を製造原料として用いる場合には、これを溶媒に溶解した後に反応させる必要があり、その反応後も一定の処理(中和や酵素反応の停止等)が必要となる。このような手間や時間、添加する試薬(酸・アルカリ、酵素等)の管理・取扱い、コスト等の事情を勘案すると、さらに簡便、迅速かつ安価に低分子化多糖を大量生産できる方法が求められていた。

SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、簡便、迅速かつ安価に低分子化多糖を大量製造できる方法、及び多糖を大量に低分子化できる方法を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、(1)電子線を多糖に照射することによって多糖が低分子化されること、(2)この低分子化は、固体状態の多糖に電子線を照射した場合にも引き起こされること、(3)電子線照射によっても多糖の骨格構造に致命的な影響はないこと、(4)硫酸基を保持する多糖であっても、電子線照射による硫酸基の損失等の影響がほとんどないこと、(5)驚くべきことに、製造原料となる多糖の平均分子量とはほとんど無関係に、一定の線量の電子線を照射すればほぼ一定の平均分子量の低分子化多糖が製造されること、特にこの傾向は製造原料となる多糖の平均分子量が大きい場合(特にHA)において顕著であること、(6)製造原料となる多糖の平均分子量がある一定の範囲内にあるときには、製造原料となる多糖の平均分子量、電子線の線量及び製造される低分子化糖の平均分子量との間に、一定の関係式が成立すること等を見出し、簡便、迅速かつ安価に低分子化多糖を大量製造で

きる方法、及び多糖を大量に低分子化できる方法を提供するに至り、本発明を完成した。

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

すなわち本発明は、多糖画分に電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化された糖の製造方法（以下、本発明製造方法という）を提供する。

また本発明は、本発明製造方法の好ましい態様として、「平均分子量がM (Da)であり、かつ固体状態の多糖画分」に、下記式を満たす線量d (kGy)の電子線を照射するステップを少なくとも含む、平均分子量n (Da)の糖の製造方法（以下、本発明製造方法1という）を提供する。

$$n = M e^{a \cdot d}$$

（ただし、Mは5000～7万の数であり、nは任意の正数であり、eは自然対数の底であり、aは-0.008～-0.004の数である。）

この「a」は、-0.008～-0.005の数であることが好ましく、-0.0075～-0.0050の数であることがより好ましい。

本発明製造方法において、電子線が照射される「多糖画分」は、GAG画分であることが好ましい。この「GAG画分」は、HA、CS（CS-A、CS-C、CS-D、CS-E等を含む）、DS、KS、HS及びHepからなる群から選ばれる1又は2以上のGAGを含有する画分であることが好ましい。

また本発明は、多糖画分に電子線を照射することの特徴とする、多糖の低分子化方法（以下、本発明低分子化方法という）を提供する。

また本発明は、本発明低分子化方法の好ましい態様として、「平均分子量がM (Da)であり、かつ固体状態の多糖画分」に、下記式を満たす線量d (kGy)の電子線を照射することの特徴とする、平均分子量n (Da)への多糖の低分子化方法（以下、本発明低分子化方法1という）を提供する。

$$n = M e^{a \cdot d}$$

(ただし、 M は5000～7万の数であり、 n は任意の正数であり、 e は自然対数の底であり、 a は $-0.008 \sim -0.004$ の数である。)

この「 a 」は $-0.008 \sim -0.005$ の数であることが好ましく、 $-0.0075 \sim -0.0050$ の数であることがより好ましい。

また、本発明低分子化方法において、電子線が照射される「多糖画分」は、GAG画分であることが好ましい。この「GAG画分」は、HA、CS (CS-A、CS-C、CS-D、CS-E等を含む)、DS、KS、HS及びHepからなる群から選ばれる1又は2以上のGAGを含有する画分であることが好ましい。

また本発明は、本発明製造方法の好ましい態様として、HA画分に電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化されたHAの製造方法（以下、本発明製造方法2という）を提供する。

また本発明は、本発明製造方法2の好ましい態様として、「平均分子量が5000～300万(Da)であり、かつ固体状態のHA画分」に、線量5～400(kGy)の電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化されたHAの製造方法を提供する。また、この製造方法のより好ましい態様として、以下のものを提供する。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が20万～300万(Da)であり、線量が5～15(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が10万～20万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が10万～300万(Da)であり、線量が15～30(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が6万～10万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が5万～300万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が3万～6万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が3万～300万(Da)であり、線量が50～150(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が2万～3万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が2万～300万(Da)であり、線量が150～250(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が1万～2万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が5000～300万(Da)であり、線量が250～350(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が3000～1万(Da)であるもの。

また本発明は、本発明製造方法2における他の好ましい態様として、「平均分子量が60万～120万(Da)であり、かつ溶液状態のHA画分」に、線量10～80(kGy)の電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化されたHAの製造方法を提供する。また、この製造方法のより好ましい態様として、以下のものを提供する。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が10～30(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が2500～4000(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が1700～2500(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が50～80(kGy)であり、かつ「低分子化されたHA」の平均分子量が1300～1700(Da)であるもの。

また本発明は、本発明低分子化方法の好ましい態様として、HA画分に電子線を照射することを特徴とする、HAの低分子化方法（以下、本発明低分子化方法2という）を提供する。

また本発明は、本発明低分子化方法2の好ましい態様として、「平均分子量が5000～300万(Da)であり、かつ固体状態のHA画分」に、線量5～400(kGy)の電子線を照射することを特徴とする、HAの低分子化方法を提供する。また、この低分子化方法のより好ましい態様として、以下のものを提供する。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が20万～300万(Da)であり、線量が5～15(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が10万～20万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が10万～300万(Da)であり、線量が15～30(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が6万～10万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が5万～300万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が3万～6万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が3万～300万(Da)であり、線量が50～150(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が2万～3万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が2万～300万(Da)であり、線量が150～250(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が1万～2万(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が5000～300万(Da)であり、線量が250～350(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が3000～1万(Da)であるもの。

また本発明は、本発明低分子化方法2における他の好ましい態様として、「平均分子量が60万～120万(Da)であり、かつ溶液状態のHA画分」に、線量10～80(kGy)の電子線を照射することを特徴とする、HAの低分子化

方法を提供する。また、この低分子化方法のより好ましい態様として、以下のものを提供する。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が10～30(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が2500～4000(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が1700～2500(Da)であるもの。

電子線が照射される「HA画分」の平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が50～80(kGy)であり、かつ低分子化後の平均分子量が1300～1700(Da)であるもの。

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

本発明製造方法

本発明製造方法は、多糖画分に電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化された糖の製造方法である。

電子線が照射される「多糖画分」の種類、分子量等は特に限定されないが、GAG画分であることが好ましい。この「GAG画分」としては、HA、CS(CS-A、CS-C、CS-D、CS-E等を含む)、DS、KS、HS及びHepからなる群から選ばれる1又は2以上のGAGを含有する画分が例示される。なかでもHA画分であることが好ましい。

電子線の照射は、一般的な電子線照射装置等を用いて行うことができる。照射の条件等も特に限定されないが、一例として以下の条件を挙げることができる。

電子線照射装置：ダイナミترون 5MeV電子加速器(RDI社製)

電圧：2.0MeV

電流：20.0mA

カート速度 (外周) : 18.0 m/分

照射方向 : 片面

多糖画分は、プラスチック、ガラス、金属等電子線を透過する容器に入れた状態でこの容器を介して電子線照射してもよく、またこのような容器を介さずに直接電子線照射してもよい。また、電子線照射される多糖画分は、固体状態 (乾燥した状態) であってもよく、溶液状態であってもよい。

このようにして多糖画分に電子線を照射すると、多糖が低分子化されて、「低分子化された糖」が製造される。そして照射する電子線の線量を高くすれば、より平均分子量が低い糖を製造することができる。照射する電子線の線量は、所望の「低分子化された糖」の平均分子量等に応じて適宜決定することもできるが、電子線照射される「多糖画分」(原料)の平均分子量が5000~7万(Da)であり、かつ固体状態である場合には、以下の式を満たす線量 d (kGy)を算出し、当該線量を照射することによって、所望の平均分子量 n (Da)の「低分子化された糖」を製造することができる。

$$n = M e^{a d}$$

この式において、「 M 」は電子線照射される「多糖画分」(原料)の平均分子量(Da)であり、5000~7万(Da)の範囲内で原料に応じて数値を設定できる。また「 n 」は「低分子化された糖」の平均分子量(Da)である。よって「 n 」は製造目的とする「低分子化された糖」の平均分子量に対応した数値 (任意の正数) とすればよい。「 e 」は自然対数の底であり、「 a 」は-0.008~-0.004の数である。

この「 a 」は、-0.008~-0.005の数であることが好ましく、-0.0075~-0.0050の数であることがより好ましい。

この式を用いることにより、製造原料となる「多糖画分」の平均分子量 (5000~7万(Da)の範囲) と、所望する「低分子化された糖」の平均分子量から、適切な照射線量を簡便に求めることができる。

また、電子線照射される「多糖画分」（原料）が「平均分子量が5000～300万(Da)であり、かつ固体状態のHA画分」である場合には、線量5～400(kGy)の電子線を照射することにより、所望の平均分子量を有する「低分子化されたHA」を製造することができる。

すなわち、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が10万～20万(Da)である場合には、原料として平均分子量が20万～300万(Da)の「HA画分」を採用し、これに5～15(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が6万～10万(Da)である場合には、原料として平均分子量が10万～300万(Da)の「HA画分」を採用し、これに15～30(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が3万～6万(Da)である場合には、原料として平均分子量が5万～300万(Da)の「HA画分」を採用し、30～50(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が2万～3万(Da)である場合には、原料として平均分子量が3万～300万(Da)の「HA画分」を採用し、50～150(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が1万～2万(Da)である場合には、原料として平均分子量が2万～300万(Da)の「HA画分」を採用し、150～250(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が3000～1万(Da)である場合には、原料として平均分子量が5000～300万(Da)の「HA画分」を採用し、250～350(kGy)の電子線を照射すればよい。

なお、原料となる「HA画分」の平均分子量は、製造される「低分子化されたHA」の平均分子量よりも高いことが必要であることはいうまでもなく、そのような条件のもとで、上記の範囲内の数値を適宜設定することができる。

この製造方法の最大の特徴は、原料となるHA画分の平均分子量を極めて幅広く設定でき、これに所定の線量の電子線を照射することにより、原料の平均

分子量にかかわらず所定の平均分子量を有する「低分子化されたHA画分」が製造できることにある。

また、電子線照射される「多糖画分」（原料）が「平均分子量が60万～120万(Da)であり、かつ溶液状態のHA画分」である場合には、線量10～80(kGy)の電子線を照射することにより、所望の平均分子量を有する「低分子化されたHA」を製造することができる。溶液状態のHA画分を原料として用いる場合には、固体状態のHA画分を用いる場合に比して低い線量で容易に低分子化を引き起こすことができる。

すなわち、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が2500～4000(Da)である場合には、原料として平均分子量が60万～120万(Da)の「HA画分」を採用し、これに10～30(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が1700～2500(Da)である場合には、原料として平均分子量が60万～120万(Da)の「HA画分」を採用し、これに30～50(kGy)の電子線を照射すればよい。

同様に、「低分子化されたHA」の所望の平均分子量が1300～1700(Da)である場合には、原料として平均分子量が60万～120万(Da)の「HA画分」を採用し、50～80(kGy)の電子線を照射すればよい。

なお本発明製造方法は、上記のような「多糖画分に電子線を照射するステップ」を少なくとも含む限りにおいて、さらに他のステップ（例えば分画や精製のステップ等）を含んでもよい。

本発明低分子化方法

本発明低分子化方法は、上記の本発明製造方法を「低分子化方法」という思想で捉えたものである。したがって、その詳細な説明は上記の本発明製造方法と同様であり、本発明製造方法における「製造方法」を「低分子化方法」と読み替えることによって、本発明低分子化方法を容易に理解することができる。

本発明製造方法および本発明低分子化方法は、医薬品や食品等の素材として有用な低分子化糖を簡便、迅速、安価かつ大量に製造でき、極めて有用である。また、電子線照射することによって低分子化と同時に滅菌することもできることから、滅菌された低分子化糖を簡便、迅速、安価かつ大量に製造することもでき、極めて有用である。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

本実施例で用いた材料や電子線照射の方法等は、以下の通りである。

(材料)

CS-A (ウシ気管由来；生化学工業株式会社製)

CS-C (サメ軟骨由来；生化学工業株式会社製)

CS-D (サメ軟骨由来；生化学工業株式会社製)

CS-E (イカ軟骨由来；生化学工業株式会社製)

DS (鶏冠由来；生化学工業株式会社製)

KS (サメ軟骨由来；生化学工業株式会社製)

HA (鶏冠由来；生化学工業株式会社製)

(電子線照射の方法等)

日本電子照射サービス株式会社 つくばセンター (日本国茨城県つくば市緑が原4-16) に委託して行った。電子線照射は、電子線照射装置 (ダイナミトロン 5MeV電子加速器；RDI社製) を用いて行った。原料画分をプラスチック製の製剤用シャーレ (原料画分が固体状態の場合) 又はガラス製のアンプル (原料画分が溶液状態の場合) に入れ、照射用カートに並べて、以下の条件で電子線照射した。

電圧：2.0MeV

電流：20.0mA

カート速度（外周）：18.0m/分

照射方向：片面

所定の線量が適正に照射されているか否かを、線量測定装置（U-2000 分光光度計；株式会社日立製作所製）及び線量計（CTA線量計 FTR-125；富士写真フイルム株式会社製）を用いて確認した。

（分子量の分析方法）

以下の条件でゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）を行って分子量を分析した。

カラム：

G6000PWL（東ソー製）（分子量5万以上のものを分析する場合）

G4000PWL+G3000PWL（東ソー製）（分子量5万以下のものを分析する場合）

溶媒：0.2M NaCl

流速：0.5mL/分

検出UV：205nm

（オリゴ糖組成の分析）

以下の条件でHPLCを行い、オリゴ糖組成を分析した。標準物質（HA4糖、6糖、8糖及び10糖）の溶出位置と比較するとともに、各糖のおよその濃度を求めた。

カラム：YMCgel-PA120-S5（株式会社ワイエムシイ製）

流速：0.5mL/分

溶出：40mM～200mM及び60mM～200mMの硫酸ナトリウムによる濃度勾配

標識：2-シアノアセトアミドによるポストラベル

検出：蛍光検出計 Ex 331nm Em 383nm

（二糖組成分析（二糖単位中に含まれる硫酸基の数・結合位置等の解析））

(1) CS又はDSを用いた場合

試料液(約200 μ g/mL)を100 μ L採取し、100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)40 μ LとコンドロイチナーゼABC(83mU; 生化学工業株式会社製)を加えて全量を200 μ Lとして37℃で2時間反応させた。反応液は10,000カットの限外ろ過フィルターでろ過した。ろ過液をHPLC(カラム: YMCゲルPA-120; 株式会社ワイエムシイ製)に付して二糖組成を分析した。

(2) KSを用いた場合

試料液(約100 μ g/mL)を100 μ L採取し、100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)40 μ LとケラタナーゼII(1mU; 生化学工業株式会社製)を加えて全量を200 μ Lとして37℃で3時間反応させた。反応液は10,000カットの限外ろ過フィルターでろ過した。ろ過液をHPLC(カラム: YMCゲルPA-120; 株式会社ワイエムシイ製)に付して二糖組成を分析した。

実施例1

各種の平均分子量のHA画分(固体状態)に、各種線量の電子線を照射して、平均分子量を解析した。結果を以下に示す。

(実験1; HA)

照射前(0 kGy)	2 5 0 0 0 0 0 (平均分子量)
1 0 kGy 照射後	1 9 9 0 0 0 (平均分子量)
2 0 kGy 照射後	9 9 0 0 0 (平均分子量)
4 0 kGy 照射後	5 2 0 0 0 (平均分子量)

(実験2; HA)

照射前(0 kGy)	1 5 0 0 0 0 0 (平均分子量)
1 0 kGy 照射後	1 3 4 0 0 0 (平均分子量)

20 kGy 照射後	74000 (平均分子量)
40 kGy 照射後	43000 (平均分子量)

(実験3 ; HA)

照射前 (0 kGy)	1100000 (平均分子量)
100 kGy 照射後	26500 (平均分子量)
200 kGy 照射後	15000 (平均分子量)
300 kGy 照射後	6400 (平均分子量)

(実験4 ; HA)

照射前 (0 kGy)	493000 (平均分子量)
100 kGy 照射後	26500 (平均分子量)
200 kGy 照射後	16500 (平均分子量)
300 kGy 照射後	6500 (平均分子量)

(実験5 ; HA)

照射前 (0 kGy)	298700 (平均分子量)
100 kGy 照射後	26200 (平均分子量)
200 kGy 照射後	13000 (平均分子量)
300 kGy 照射後	7200 (平均分子量)

(実験6 ; HA)

照射前 (0 kGy)	62000 (平均分子量)
100 kGy 照射後	23000 (平均分子量)
200 kGy 照射後	15500 (平均分子量)
300 kGy 照射後	7000 (平均分子量)

(実験7 ; HA)

照射前 (0 kGy)	6100 (平均分子量)
300 kGy 照射後	4200 (平均分子量)

以上の結果から、原料となるHAの平均分子量の如何に関わらず、一定線量を照射するとほぼ一定の平均分子量に低分子化されることが示された。

実施例2

各種の平均分子量のHA画分（水溶液；濃度10mg/mL）に、各種線量の電子線を照射して、平均分子量を解析した。結果を以下に示す。

照射前 (0 kGy)	850000 (平均分子量)
20 kGy 照射後	3200 (平均分子量)
40 kGy 照射後	1900 (平均分子量)
60 kGy 照射後	1500 (平均分子量)

この結果から、原料となるHA画分が溶液状態であっても電子線により低分子化できること、および、固体状態の場合よりも低分子化されやすいことが示された。

実施例3

実施例1の実験3、実験4、実験6及び実験7、並びに実施例2における電子線照射後の画分中におけるオリゴ糖組成を分析した。結果を表1に示す。

表 1

試料	照射線量 (kGy)	平均分子量 (Da)	濃度(%)			
			4糖	6糖	8糖	10糖
HA(実施例1・実験3)	100	26500	0.4	0.3	0.2	0.2
	200	15000	1.0	0.8	0.6	0.4
	300	6400	2.6	1.6	1.0	0.7
HA(実施例1・実験4)	100	26500	0.3	0.2	0.2	0.1
	200	16500	0.9	0.8	0.6	0.4
	300	8500	2.1	1.6	1.0	1.0
HA(実施例1・実験6)	100	23000	0.4	0.3	0.2	0.2
	200	15500	1.1	0.8	0.6	0.5
	300	7000	2.1	1.5	0.9	0.8
HA(実施例1・実験7)	300	4200	5.3	4.5	4.0	3.2
HA(実施例2)	20	3200	2.0	2.2	2.2	1.1
	40	1900	4.5	4.0	3.2	1.6
	60	1500	6.4	5.8	3.4	1.6

表 1 より、電子線照射によって各種サイズのオリゴ糖を製造することができることも確認された。よって本発明製造方法は、「オリゴ糖の製造方法」としても利用できることが示された。

実施例 4

各種の硫酸化GAG画分（固体状態）に、各種線量の電子線を照射して、二糖組成および平均分子量を解析した。結果を表 2（CS又はDSを用いた場合）及び表 3（KSを用いた場合）に示す。なお、表中の「OS」、「6S」、「4S」、「SD」、「SB」、「SE」、「M-KS」及び「D-KS」は、それぞれ、硫酸基の数・結合位置等をも含めた特定の二糖構造を示す略号である。

表 2

試料	照射線量 (kGy)	二糖組成比率(%)						平均分子量 (Da)
		OS	6S	4S	SD	SB	SE	
CS-D	0	0.8	44.5	27.9	23.0	-	3.8	28,826
	100	1.2	46.8	26.5	21.9	-	3.6	15,577
	200	1.9	46.9	25.8	22.0	-	3.5	8,851
	300	2.4	47.3	25.6	21.3	-	3.4	4,409
CS-C	0	5.5	45.8	32.8	13.8	-	2.1	8,336
	100	5.7	46.2	32.7	13.4	-	2.0	4,451
	200	6.2	46.1	32.5	13.1	-	2.0	3,871
	300	6.4	46.4	31.9	13.2	-	2.0	3,013
CS-A	0	5.0	33.4	60.6	0.5	-	0.4	14,696
	100	5.4	33.4	60.2	0.5	-	0.4	11,222
	200	6.0	33.6	59.6	0.4	-	0.4	8,555
	300	6.5	33.7	59.0	0.4	-	0.4	4,834
CS-E	0	4.0	14.1	20.2	-	-	61.7	42,316
	100	3.8	14.1	20.2	-	-	61.9	10,170
	200	3.8	14.4	21.0	-	-	60.9	7,756
	300	4.3	14.6	21.0	-	-	60.1	4,465
DS	0	3.9	7.3	82.2	1.1	5.5	-	45,942
	100	4.0	7.2	82.2	1.1	5.7	-	21,084
	200	3.9	7.2	82.4	1.0	5.5	-	11,523
	300	4.5	7.2	81.8	1.0	5.5	-	4,974

表 3

試料	照射線量 (kGy)	二糖組成比率(%)		平均分子量 (Da)
		M-KS	D-KS	
KS	0	1.2	98.8	12,167
	100	1.5	98.5	9,959
	200	1.7	98.3	6,739
	300	2.0	98.0	5,283
KS	0	2.0	98.0	7,373
	100	3.1	96.9	4,743
	200	2.9	97.1	4,974
	300	3.0	97.0	4,451

なお、M-KSとは、KSの二糖単位中のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の6位のみに硫酸基を保持するものを、D-KSとは、KSの二糖単位中のガラクトー

ス(Gal)残基の6位とN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の6位との両方に硫酸基を保持するものを意味する。

この結果から、原料が硫酸化GAG画分であってもHA画分と同様に電子線で低分子化できること、および、電子線照射によっても二糖組成（二糖単位中に含まれる硫酸基の数・結合位置等）にほとんど影響を与えないことが示された。

また、実施例1と実施例4の結果を用いて回帰分析した結果、原料とする多糖画分の平均分子量(M)が5000～7万の場合には、以下の関係式が成立することが見いだされた。

$$n = M e^{a d}$$

M：原料とする多糖画分の平均分子量(Da) (5000～7万)

n：電子線照射後の平均分子量(Da)

e：自然対数の底

a：-0.0075～-0.0050

d：照射した電子線の線量(kGy)

また、電子線照射後の画分について核磁気共鳴スペクトル(NMR)分析を行った結果、電子線照射によっても多糖の骨格構造に致命的な影響がないことが示唆された。

While the present invention has been described in detail and with reference to specific embodiments thereof, it will be apparent to one of skill in the art that various changes and modifications can be made therein without departing from the spirit and scope thereof. All references cited herein are incorporated in their entirety.

What is claimed is:

1. 多糖画分に電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化された糖の製造方法。

2. 電子線が照射される「多糖画分」が固体状態であり、電子線が下記式を満たす線量 d (kGy) で照射される、請求項 1 記載の方法。

$$n = M e^{a d}$$

ただし、 M は「多糖画分」の重量平均分子量 (Da) を表し、かつ、5000～7万の数であり、 n は「低分子化された糖」の重量平均分子量 (Da) を表し、かつ、任意の正数であり、 e は自然対数の底であり、 a は $-0.008 \sim -0.004$ の数である。

3. a が $-0.008 \sim -0.005$ の数である、請求項 2 に記載の方法。

4. a が $-0.0075 \sim -0.0050$ の数である、請求項 3 に記載の方法。

5. 電子線が照射される「多糖画分」が、グリコサミノグリカン画分である、請求項 1 に記載の方法。

6. 「グリコサミノグリカン画分」が、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸及びヘパリンからなる群から選ばれる 1 又は 2 以上のグリコサミノグリカンを含有する画分である、請求項 5 に記載の方法。

7. 多糖画分に電子線を照射することを特徴とする、多糖の低分子化方法。

8. 電子線が照射される「多糖画分」が固体状態であり、電子線が下記式を満たす線量 d (kGy) で照射される、請求項 7 記載の方法。

$$n = M e^{a d}$$

ただし、 M は「多糖画分」の重量平均分子量 (Da) を表し、かつ、5000～7 万の数であり、 n は「低分子化された糖」の重量平均分子量 (Da) を表し、かつ、任意の正数であり、 e は自然対数の底であり、 a は $-0.008 \sim -0.004$ の数である。

9. a が $-0.008 \sim -0.005$ の数である、請求項 8 に記載の方法。

10. a が $-0.0075 \sim -0.0050$ の数である、請求項 9 に記載の方法。

11. 電子線が照射される「多糖画分」が、グリコサミノグリカン画分である、請求項 7 に記載の方法。

12. 「グリコサミノグリカン画分」が、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸及びヘパリンからなる群から選ばれる 1 又は 2 以上のグリコサミノグリカンを含有する画分である、請求項 11 に記載の方法。

13. ヒアルロン酸画分に電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化されたヒアルロン酸の製造方法。

14. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」が5000～300万(Da)の重量平均分子量を有し、かつ固体状態であり、電子線が5～400(kGy)の線量で照射される、請求項13記載の方法。

15. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が20万～300万(Da)であり、線量が5～15(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が10万～20万(Da)である、請求項14に記載の方法。

16. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が10万～300万(Da)であり、線量が15～30(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が6万～10万(Da)である、請求項14に記載の方法。

17. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が5万～300万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が3万～6万(Da)である、請求項14に記載の方法。

18. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が3万～300万(Da)であり、線量が50～150(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が2万～3万(Da)である、請求項14に記載の方法。

19. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が2万～300万(Da)であり、線量が150～250(kGy)であり、かつ「低分子

化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が1万～2万(Da)である、請求項14に記載の方法。

20. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が5000～300万(Da)であり、線量が250～350(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が3000～1万(Da)である、請求項14に記載の方法。

21. 「重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、かつ溶液状態のヒアルロン酸画分」に、線量10～80(kGy)の電子線を照射するステップを少なくとも含む、低分子化されたヒアルロン酸の製造方法。

22. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が10～30(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が2500～4000(Da)である、請求項21に記載の方法。

23. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が1700～2500(Da)である、請求項21に記載の方法。

24. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が50～80(kGy)であり、かつ「低分子化されたヒアルロン酸」の重量平均分子量が1300～1700(Da)である、請求項21に記載の方法。

25. ヒアルロン酸画分に電子線を照射することを特徴とする、ヒアルロン酸の低分子化方法。

26. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」が5000～300万(Da)の重量平均分子量を有し、かつ固体状態であり、電子線が5～400(kGy)の線量で照射される、請求項25記載の方法。

27. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が20万～300万(Da)であり、線量が5～15(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が10万～20万(Da)である、請求項26に記載の方法。

28. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が10万～300万(Da)であり、線量が15～30(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が6万～10万(Da)である、請求項26に記載の方法。

29. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が5万～300万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が3万～6万(Da)である、請求項26に記載の方法。

30. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が3万～300万(Da)であり、線量が50～150(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が2万～3万(Da)である、請求項26に記載の方法。

31. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が2万～300万(Da)であり、線量が150～250(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が1万～2万(Da)である、請求項26に記載の方法。

32. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が5000～300万(Da)であり、線量が250～350(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が3000～1万(Da)である、請求項26に記載の方法。

33. 「重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、かつ溶液状態のヒアルロン酸画分」に、線量10～80(kGy)の電子線を照射することを特徴とする、ヒアルロン酸の低分子化方法。

34. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が10～30(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が2500～4000(Da)である、請求項33に記載の方法。

35. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が30～50(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が1700～2500(Da)である、請求項33に記載の方法。

36. 電子線が照射される「ヒアルロン酸画分」の重量平均分子量が60万～120万(Da)であり、線量が50～80(kGy)であり、かつ低分子化後の重量平均分子量が1300～1700(Da)である、請求項33に記載の方法。

ABSTRACT OF DISCLOSURE

多糖画分に電子線を照射することを含む、低分子化された糖の製造方法。また、重量平均分子量がM (Da)であり、かつ固体状態の多糖画分に、下記式を満たす線量d (kGy)の電子線を照射することを含む、重量平均分子量n (Da)の糖の製造方法。

$$n = M e^{a \cdot d}$$

(ただし、Mは5000～7万の数であり、nは任意の正数であり、eは自然対数の底であり、aは-0.008～-0.004の数である。)。さらに、ヒアルロン酸画分に電子線を照射することを含む、低分子化されたヒアルロン酸の製造方法。